

Evaluasi Polimorfisme *Leu/Val* pada Gen Hormon Pertumbuhan Sapi Friesian Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Perah Baturraden

(Evaluation of Polymorphism of *Leu/Val* of Growth Hormone Gene in Friesian Holstein Cows at Breeding Centre of Dairy Cattle Baturraden)

MA Mu'in^{1*} dan N Zurahmah²

¹Fakultas Peternakan Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Negeri Papua
Jalan Gunung Salju, Amban, Manokwari 98314, Indonesia

²Jurusan Penyuluhan Peternakan, Sekolah Tinggi Penyuluhan Pertanian
Jalan SPMA, Reremi, Manokwari 98312, Indonesia

*Correspondence author email: muinunipa@gmail.com

Abstract. The *Leu/Val* polymorphism of the growth hormone evaluation was studied in 35 Friesian Holstein dairy cow at Baturraden Breeding Centre of Dairy Cattle. A 211 bp DNA fragment of GH gene spanning from the forth intron region (49 bp) to fifth of exon (162 bp) was amplified and digested with *AluI* restriction enzyme to identified polymorphism at this locus. Allele frequencies of variant *Leu* (leucine) and *Val* (valine) were 0.91 and 0.09, respectively. Selection to raising of *Val* allele frequencies have probably to increase of milk production at population of Friesian Holstein dairy cow at Baturraden Breeding Centre of Dairy Cattle.

Key Words: gene, growth hormone, *Leu/Val* polymorphism, Friesian Holstein

Pendahuluan

Growth hormone (GH) adalah suatu polipeptida yang disekresikan oleh kelenjar adenohipofise (*anterior pituitary*) ke dalam darah (Hadley, 1992), dan memberikan efek biologi terhadap pertumbuhan, laktasi, perkembangan ambing dan diferensiasi sel (Hoj *et al.*, 1993; Davis dan Simmen, 1997; Etherton dan Bauman, 1998). Konsentrasi GH dalam plasma cenderung lebih tinggi pada kelompok sapi induk yang terseleksi untuk produksi susu tinggi dibandingkan kelompok sapi induk yang terseleksi untuk produksi susu rendah (Kazmer *et al.*, 1986).

Pada sapi, GH merupakan protein yang tersusun atas 191 asam amino dan disandi oleh suatu gen yang terletak pada kromosom 19 dalam genom sapi (Hediger *et al.*, 1990; Schlee *et al.*, 1994). Panjang gen GH sapi *Bos taurus* adalah 2856 bp, dan panjang daerah *coding* adalah 1826 bp dan terdiri dari lima *exon* yang dipisahkan oleh empat *intron* (Woychick *et al.*, 1982; Gordon *et al.*, 1983). Pada *exon* kelima dari gen GH sapi ditemukan polimorfisme nukleotida tunggal (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) yang disebabkan oleh adanya substitusi sebuah

nukleotida, *cytosine* (C) terhadap *guanine* (G) pada posisi 2141 (*GenBank Accession* No. M57764; Gordon *et al.*, 1983). Mutasi ini mengakibatkan perubahan urutan asam amino pada posisi 127 dari rantai polipeptida, yaitu dari *leucine* (CTG, alel *Leu*) menjadi *valine* (GTG, alel *Val*) (Zhang *et al.*, 1992).

Grochowska *et al.* (2001) melaporkan bahwa puncak pelepasan GH, kecepatan GH dan IGF-I merupakan sifat yang diwariskan pada sapi perah dara dan dipengaruhi oleh polimorfisme *Leu/Val* pada gen GH. Diinformasikan bahwa genotip *Val/Val* mencapai nilai puncak produksi GH tertinggi dibandingkan dengan genotip GH lainnya, sedangkan genotip *Leu/Leu* mempunyai konsentrasi IGF-I tertinggi. Selain itu, genotip heterosigot *Leu/Val* lebih unggul dibandingkan genotip lainnya dalam menghasilkan susu dan protein susu, sedangkan *Leu/Leu* menghasilkan produksi lemak tertinggi.

Frekuensi alel *Leu* dan alel *Val* bervariasi antara bangsa sapi perah, dan beberapa penelitian melaporkan bahwa alel *Val* berhubungan dengan tingginya sifat-sifat produksi susu pada sapi perah (Krivi *et al.*, 1989

dalam Chikuni *et al.*, 1997; Lucy *et al.*, 1991; 1993; Zhang *et al.*, 1992; Grochowska *et al.*, 2001). Polimorfisme *Leu/Val* dari gen GH pada sapi perah memungkinkan dapat dimanfaatkan sebagai penciri molekuler untuk membantu seleksi perbaikan produksi susu. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi polimorfisme *Leu/Val* pada gen GH dalam populasi sapi Friesian Holstein (FH) di Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Sapi Perah Baturraden.

Metode Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Biokimia, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Materi dalam penelitian ini adalah sampel DNA genom berasal dari 35 sapi induk FH yang diambil secara acak di BPTU Sapi Perah Baturraden.

Amplifikasi fragmen DNA spesifik dari gen GH sapi FH berukuran 211 bp (merentang dari *intron* 4 sepanjang 49 bp sampai *exon* 5 sepanjang 162 bp) dilakukan menggunakan sepasang primer, GH-forward: 5'-GCTGCTCCTGAGGGCCCTTC-3' dan GH-reverse: 5'-CATGACCCTCAGGTACGTCTCCG-3' (Reis *et al.*, 2001). Primer tersebut dipesan pada *CyberGene AB*. Sebanyak 19 µl dH₂O, 2 µl larutan DNA (±50 ng) serta primer GHF dan GHR masing-masing 2 µl (16 pmol) dimasukkan ke dalam tabung 0,2 ml *Ready-To-Go™ PCR Bead* (Amersham Biosciences). Selanjutnya campuran dihomogenkan dan di *running* dalam mesin *Thermal Cycler*, yang sebelumnya kondisi mesin diprogram sebagai berikut: denaturasi awal 95°C selama 5 menit, dilanjutkan amplifikasi sebanyak 35 siklus, dimana setiap siklus diprogram: denaturasi 95°C selama 30 detik, *annealing* 65°C selama 30 detik, ekstensi 72°C selama 30 detik. Proses amplifikasi diakhiri dengan ekstra ekstensi pada 72°C selama 5 menit.

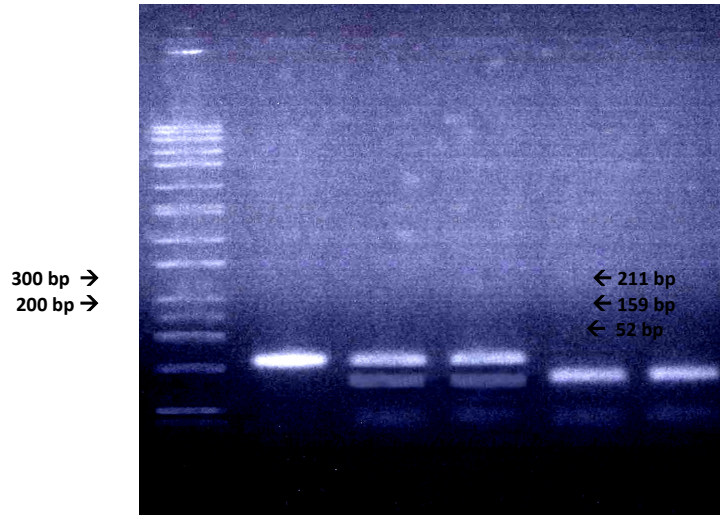
Hasil amplifikasi (produk PCR) yang diperoleh kemudian didigesti dengan enzim restriksi *AluI* (situs pemotongan 5'-AG▼CT-3', produksi Takara Bio Inc.). Sebanyak 10 µl produk PCR, 2 µl 10X L Bufer dan 0,5 µl enzim *AluI* (10 unit/µl) dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* 1,5 ml, ditambahkan dH₂O hingga 20 µl, dan diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 2 jam. Produk digesti dari setiap sampel DNA, diambil 10 µl dan dicampur 5 µl *loading bufer*, lalu dielektroforesis pada gel agarose 2%

mengandung etidium bromida dalam bufer TAE. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Salah satu sumur pada gel yang sama dilibatkan *marker DNA* (*DirectLoad™ Wide Range DNA Marker*, produksi Sigma). Hasil elektroforesis diperiksa dibawah sinar *ultraviolet*, kemudian di dokumentasikan menggunakan kamera polaroid. Identifikasi genotip dilakukan menurut petunjuk Reis *et al.* (2001), yaitu genotip *Val/Val* ditunjukkan oleh satu pita: 211 bp, genotip *Leu/Val* oleh tiga pita: 211 bp, 159 bp, dan 52 bp, dan genotip *Leu/Leu* oleh dua pita: 159 bp dan 52 bp. Selanjutnya dilakukan penghitungan frekuensi genotip dan alel serta uji keseimbangan *Hardy-Weinberg* (Warwick *et al.*, 1983).

Hasil dan Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis RFLP menggunakan enzim restriksi *AluI* terhadap produk PCR, berupa fragmen DNA spesifik dari gen GH berukuran 211 bp yang merentang dari *intron* 4 (49 bp) sampai *exon* 5 (162 bp), ditemukan dua macam genotip, yaitu genotip *Leu/Leu* dan *Leu/Val*. Genotip *Leu/Leu* dicirikan dengan munculnya dua fragmen restriksi (2 pita) pada gel hasil elektroforesis produk digesti, yaitu fragmen berukuran 159 bp dan 52 bp, sedangkan genotip *Leu/Val* yang dicirikan dengan munculnya tiga fragmen restriksi (3 pita) pada gel hasil elektroforesis produk digesti, yaitu fragmen berukuran 211 bp, 159 bp, dan 52 bp (Gambar 1). Dalam penelitian ini tidak ditemukan genotip *Val/Val* pada sapi-sapi penelitian. Dengan demikian frekuensi genotip *Leu/Leu*, *Leu/Val* dan *Val/Val* pada sapi FH di BPTU Sapi Perah Baturraden berturut-turut sebesar 83, 17 dan 0%. Hasil penghitungan frekuensi alel *Leu* dan *Val* pada kelompok sapi penelitian masing-masing sebesar 0,91 dan 0,09. Bahwa alel *Leu* pada sapi perah umumnya lebih tinggi dibandingkan alel *Val* telah dilaporkan (Lucy *et al.*, 1991; 1993; Krivi *et al.*, 1989 dalam Chikuni *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1992; Grochowska *et al.*, 2001). Harris (1994) menyatakan bahwa bila frekuensi alel terbanyak dari suatu lokus ditemukan tidak melebihi 0,99, maka lokus tersebut dikategorikan sebagai lokus polimorfik.

Berdasarkan batasan tersebut maka lokus yang dipelajari (GH/Exon-V/*AluI*) dari gen GH pada sapi FH di BPTU Sapi Perah Baturraden ini dikategorikan sebagai lokus polimorfik.



Gambar 1. Hasil elektroforesis PCR-RFLP *AluI* gen GH sapi FH di Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Perah Baturaden

[Lajur 1:DNA Marker (M); lajur 2:produk PCR (U= *uncut*; 211bp); lajur 3 dan 4: genotip *Leu/Val* (211 bp, 159 bp dan 52 bp); lajur 5 dan 6: genotip *Leu/Leu* (159 bp dan 52 bp)]

....	5	15	25	35	45	55
<u>GCTGCTCCTG AGGGCCCTTC</u> GGCCTCTCTG TCTCTCCCTC CCTTGGCAGG <u>AG▼CT</u> GGAAGA						
Primer GH Forward →						
....	65	75	85	95	105	115
TGGCACCCCC CGGGCTGGGC AGATCCTCAA GCAGACCTAT GACAAATTTG ACACAAACAT						
....	125	135	145	155	165	175
GCGCAGTGAC GACGCGCTGC TCAAGAACTA CGGTCTGCTC TCCTGCTTCC GGAAGGACCT						
....	185	195	205			
<u>GCATAAGACG GAGACGTACC TGAGGGTCAT G</u>						
← Primer GH Reverse						

AG▼CT pada urutan 51 – 54 merupakan situs pemotongan *AluI*. Sekuen ke-53 ditempati nukleotida C atau G.

Gambar 2. Sekuen fragmen DNA spesifik berukuran 211 bp (diapit oleh sepasang primer), merentang dari *intron IV* (49 bp) sampai *exon V* (162 bp) dari gen GH sapi dan situs pemotongan enzim restriksi *AluI* (5'..AG▼CT..3')

(Sumber: *GenBank* No. M57764; Gordon *et al.*, 1983)

Tabel 1. Uji χ^2 terhadap genotip GH populasi sapi FH di BPTU Sapi Perah Baturraden

Jumlah	Genotip GH			Frekuensi Alel		χ^2
	<i>Leu/Leu</i>	<i>Leu/Val</i>	<i>Val/Val</i>	<i>Leu</i>	<i>Val</i>	
<i>Observed</i>	29	6	0	0.91	0.09	0.2959
<i>Expected</i>	28.9835	5.7330	0.2835			

$\chi^2_{0.05; 2} = 5.99$

Frekuensi alel *Leu* dan *Val* yang ditemukan dalam penelitian ini hampir sama dengan frekuensi alel *Leu* dan *Val* dari beberapa bangsa sapi perah yang pernah dilaporkan Lucy *et al.* (1993), khususnya pada sapi Holstein (*Leu*=0,93 dan *Val*=0,07) dan Guernsey (*Leu*=0,92 dan *Val*=0,08), namun berbeda cukup jauh dengan sapi Ayrshire (*Leu*=0,79 dan *Val*=0,21), sapi Friesian (*Leu*=0,69 dan *Val*=0,31), dan Jersey (*Leu*=0,55 dan *Val*=0,44).

Hukum *Hardy-Weinberg* menyatakan bahwa frekuensi genotip (p^2 , $2pq$ dan q^2) dan frekuensi alel (p dan q) dalam suatu populasi akan tetap sama dari generasi ke generasi selama dalam populasi tersebut anggota-anggota populasi kawin secara acak, tidak terjadi seleksi, tidak terjadi mutasi, dan tidak terjadi migrasi (Warwick *et al.*, 1983). Untuk mengetahui apakah distribusi genotip GH pada populasi sapi FH di BPTU Sapi Perah Baturraden menyimpang atau tidak menyimpang dari keseimbangan *Hardy-Weinberg*, telah dilakukan uji Khi-Kuadrat (χ^2) terhadap populasi sapi penelitian tersebut. Hasil uji χ^2 (Tabel 1) menunjukkan bahwa distribusi genotip GH pada populasi sapi penelitian tidak menyimpang dari keseimbangan *Hardy-Weinberg* ($P < 0.05$). Banyaknya pengamatan (*observed*) dan banyaknya yang diharapkan (*expected*) dari genotip GH pada populasi sapi FH dalam penelitian ini memperlihatkan perbandingan yang relatif sama untuk semua genotip. Status keseimbangan *Hardy-Weinberg* pada populasi sapi penelitian ini memberi pengertian bahwa frekuensi alel dan genotip pada populasi sapi penelitian tersebut akan tetap konstan dari satu generasi ke generasi berikutnya selama tidak terdapat faktor-faktor pengganggu, yaitu tidak terjadi seleksi, tidak terjadi mutasi, tidak terjadi migrasi, dan perkawinan antar individu dalam populasi tersebut terjadi secara acak.

Beberapa penelitian melaporkan bahwa terdapat hubungan polimorfisme *Leu/Val* gen GH dengan sifat-sifat produksi susu pada sapi perah. Lucy *et al.* (1991) dan Zhang *et al.* (1992) menemukan hubungan polimorfisme *Leu/Val* gen GH dengan produksi susu. Grochowska *et al.* (2001) melaporkan bahwa variasi genetik GH berhubungan dengan produksi susu, lemak susu maupun protein susu pada sapi Polish Friesian, dimana genotip heterosigot *Leu/Val* lebih unggul dibandingkan genotip lainnya dalam

menghasilkan susu dan protein susu, sedangkan *Leu/Leu* menghasilkan produksi lemak tertinggi. Dilain pihak, pada bangsa sapi Yaroslavl dan sapi German Black-and-White, Khatami *et al.* (2005) melaporkan bahwa kadar lemak tertinggi dalam air susu ditemukan pada sampel-sampel dari induk dengan genotip heterosigot *Leu/Val*. Zwierzchowski *et al.* (2002) melaporkan bahwa induk yang membawa alel *Val* memiliki produksi susu dan komposisi susu lebih baik. Berdasarkan beberapa laporan penelitian di atas, maka polimorfisme *Leu/Val* yang ditemukan pada sapi Friesian Holstein di BPTU Sapi Perah Baturraden ini dapat dipertimbangkan untuk diikutsertakan sebagai salah satu kriteria seleksi dalam program perbaikan genetik produksi susu sapi Friesian Holstein di BPTU Sapi Perah Baturraden. Seleksi peningkatan frekuensi alel *Val* berpeluang meningkatkan sifat-sifat produksi susu pada populasi sapi perah Friesian Holstein di BPTU Sapi Perah Baturraden. Penggunaan pejantan bergenotip *Leu/Val* dan *Val/Val* akan mempercepat peningkatan frekuensi alel *Val* pada populasi ini.

Kesimpulan

Polimorfisme *Leu/Val* gen GH ditemukan pada populasi sapi Friesian Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Perah Baturraden. Alel *Leu* memiliki frekuensi lebih tinggi dibandingkan alel *Val*. Seleksi peningkatan frekuensi alel *Val* berpeluang meningkatkan produksi susu pada populasi sapi perah Friesian Holstein di Balai Pembibitan Ternak Unggul Sapi Perah Baturraden.

Ucapan Terimakasih

Penulis menyampaikan terimakasih kepada Ibu Hasanatun Hasinah, SPt., MP. atas bantuan sampel DNA genom sapi Perah Friesian Holstein asal Balai Pembibitan Ternak Unggul (BPTU) Sapi Perah Baturraden.

Daftar Pustaka

- Chikuni K, Y Fukumoto, R Tanabe, S Muroya dan S Ozawa. 1997. Short Communication : A Simple Method for Genotyping the Bovine Growth Hormone Gene. *Anim. Gen.* 28 : 230– 232.
- Davis ME, and RCM Simmen. 1997. Genetic Parameter Estimates for Serum Insulin-like Growth Factor-I

- Concentration and Performance Traits in Angus Beef Cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317-324.
- Etherton TD and DE Bauman. 1998. Biology of Somatotropin in Growth and Lactation of Domestic Animals. *Physical Rev.* 78:745-761.
- Gordon DF, DP Quick, CR Erwin, JE Donelson and RA Maurer. 1983. Nucleotide Sequence of the Bovine Growth Hormone Chromosomal Gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 33(1): 81-95.
- Grochowska R, P Sorensen, L Zwierzchowski, M Snochowski and P Lovendahl. 2001. Genetic Variation in Stimulated GH Release and in IGF-I of Young Dairy Cattle and Their Associations with the Leucine/Valine Polymorphism in the GH Gene. *J. Anim. Sci.* 79:450-476.
- Hadley ME. 1992. Endocrinology. 3rd Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey 07632.
- Harris H. 1994. Dasar-Dasar Genetika Biokemis Manusia. Edisi ketiga, diperbaharui Penerjemah: dr. Abdul Salam M. Sofro, Ph.D. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Hediger R, SE Johnson, W Barendse, RE Drinkwater, SS Moore and J Hetzel. 1990. Assignment of the GH gene locus to 19q26qter in cattle and to 11q25qter in sheep by in situ hybridization. *Genomic* 8: 171-174.
- Hoj S, M Fredholm, NJ Larsen and VH Nielsen. 1993. Growth Hormone Gene Polymorphism Associated with Selection for Milk Fat Production in Lines of Cattle. *Anim. Gen.* 24: 91-96.
- Khatami S, O Lazebny, V Maksimenko, and G Sulimova, 2005. Association of DNA Polymorphisms of the Growth Hormone and Prolactin Genes with Milk Productivity in Yaroslavl and Black-and-White Cattle. *Russian J. of Gen.* 41(2):167-173.
- Kazmer GW, Barnes MA, Akers RM, Pearson RE. 1986. Effect of genetic selection for milk yield and increased milking frequency on plasma growth hormone and prolactin concentration in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63:1220- 227.
- Lucy MC, SD Hauser, PJ Eppard, GG Krivi and RJ Collier. 1991. Genetic Polymorphism within the Bovine Somatotropin (bST) Gene Detected by Polymerase Chain Reaction and Endonuclease Digestion. *J. Dairy Sci.* 74(Suppl.1):284.
- Lucy MC, SD Hauser, PJ Eppard, GG Krivi, JH Clark, DE Bauman and RJ Collier. 1993. Variants of Somatotropin in Cattle: Gene Frequencies in Major Dairy Breeds and Associated Milk Production. *Domest. Anim. Endoc.* 10(4): 325-333.
- Reis, C, D Navas, M Pereira and A Cravador, 2001. Growth Hormone AluI Polymorphism Analysis in Eight Portuguese Bovine Breeds. *Arch. Zootec.* 50:41-48.
- Schlee P, R Graml, O Rottmann and F Pirchner. 1994. Influence of Growth Hormone Genotypes on Breeding Values of Simmental Bulls. *J. Anim. Breed. Genet.* 111:253-256.
- Warwick EJ, JM Astuti dan W Hardjosubroto. 1983. *Pemuliaan Ternak*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Woychick RP, SA Camper, RH Lyons, S Horowitz, EC Goodwin and FM Rottman. 1982. Cloning and Nucleotide Sequencing of the Bovine Growth Hormone Gene. *Nucleic Acids Res.* 10(22):7197-7210.
- Zhang HK, KC Maddock, DR Brown, SK DeNise and RL Ax. 1992. Bovine Growth Hormone Gene Frequencies in Samples of U.S. AI Bulls. *J. Anim. Sci.* 71 (Suppl.1): 93.
- Zwierzchowski L, J Krzyewski, N Strzakowska, E Siadkowska and Z Ryniewicz. 2002. Effects of Polymorphism of Growth Hormone (GH), Pit-1, and Leptin (LEP) Genes, Cow Age, Lactation Stage and Somatic Cell Count on Milk Yield and Composition of Polish Black-and-White Cows.